

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GÊNICOS E PERDA
PRECOCE DE IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia Buco-Dental

Piracicaba 2004

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GÊNICOS E PERDA
PRECOCE DE IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia Buco-Dental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line (FOP-UNICAMP)

Piracicaba 2004

Ficha Catalográfica

Sa59a	<p>Santos, Maria Cristina Leme Godoy dos. Associação entre polimorfismos gênicos e perda precoce de implantes osseointegrados. / Maria Cristina Leme Godoy dos Santos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. ix, 50f. : il.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Implantes dentários osseointegrados. 2. Genética. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

**Ao meu grande amor,
meu pai.**

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), pela utilização de suas instalações desde a minha graduação e por tudo o mais que me foi oferecido.

Ao Prof. **Sergio Roberto Peres Line**, meu mestre e orientador, que me ensina a crescer com paciência, dedicação e carinho. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. **Thales da Rocha Mattos Filho**, atual Diretor da FOP-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. **Lourenço Correr Sobrinho**, Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e a Profa. Dra. **Silvana Pereira Barros**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pela amizade e prontidão em ajudar.

Ao Prof. Dr. **Pedro Duarte Novaes**, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), por ser tão solícito em nos atender a qualquer tempo, e por permitir a utilização dos laboratórios durante o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Aos demais professores do Departamento de Morfologia, especialmente a Profa Dra. **Darcy de Oliveira Tosello**, ao Prof. Dr. **José Merzel** e ao Prof. Dr. **Fausto Bérzin**, o meu muito obrigada pela contínua disponibilidade e simpatia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo patrocínio oferecido para execução deste trabalho.

Prof. Dr. **Renato Mazzonetto**, Dr. **Ataualpa Meneghel** e Dr. **Fábio Bezerra** por possibilitar a realização desse trabalho disponibilizando seus pacientes.

Aos voluntários que gentilmente cederam aos apelos da ciência e contribuíram com a execução dos bochechos na cessão do material de estudo.

À *Sônia, Érica e Eliane*, secretárias da Pós-Graduação, pelo auxílio durante todo o curso.

Às funcionárias do Departamento de Morfologia, *Eliene, Cidinha, Suzete, Ivani, Joelma e Valquiria* pela simpatia e ajuda.

Aos amigos do Programa de Biologia Buço-Dental *Silvana, Regina, Marco, Soninha, Marcelo, Cristiane Salmon, Isabela, Alexandre, Isabel, Cristiane Borges, Daniel, Eduardo e Marisi* pelo gostoso convívio do dia a dia.

À *Paula Trevilatto, Ana Paula de Souza, Raquel Scarel-Caminaga, Raquel Gerlach e Rui Barbosa* pela amizade e por dividirem comigo seus conhecimentos desde minha iniciação científica.

A *Jorge*, pela amizade e disposição em corrigir os artigos e cartas.

Aos amigos *Re, Jú, Gi, Caio, Ramiro, Pimenta e família, Vedana, Pinga e Bruninha*, por poder dividir com vocês minhas alegrias e tristezas.

Ao *Filipe* pelo companheirismo e carinho em todos os momentos.

A *Pri* por me ajudar tanto e pela importância que tem em minha vida.

Aos meus *avos, tios, tias, primos e primas* por participarem de todos meus passos, a vocês dedico todo meu carinho.

Aos meus irmãos *Rafa, Deco, Juba* e *Nandinho* por serem meus heróis, meus eternos amores.

A *mamãe* e ao *papai* pelo amor com que me guiaram até aqui.

SUMÁRIO

	Página
Listas de Abreviaturas, Unidades, Siglas e Palavras em outro Idioma.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
REVISÃO DA LITERATURA.....	6
PROPOSIÇÃO.....	15
MATERIAIS E MÉTODO.....	16
Tabela 1: Características dos pacientes.....	16
Tabela 2: Informações sobre condições das reações de PCR e RFLP.....	19
RESULTADOS.....	21
Tabela 3: Média de idade, frequência de gênero dos indivíduos e porcentagem de implantes em cada região.....	21
Tabela 4: Implantes perdidos conforme tempo de colocação de <i>abutment</i> e posição no arco (região).....	22
Tabela 5: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-1.....	23
Tabela 6: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-9.....	24
Tabela 7: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene do TGF- β_1	25
Tabela 8: Distribuição dos haplótipos em alelos e genótipos do gene do TGF- β_1	26
Tabela 9: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da IL-2.....	27
Figura 1: Géis de poliacrilamida corados pela prata.....	28
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	34
Anexo 1: Certificado Comitê de Ética.....	47
Anexo 2: Características clínicas do grupo controle.....	48
Anexo 3: Características clínicas do grupo teste.....	49
Anexo 4: Lista de artigos extraídos desta dissertação.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES, SIGLAS E PALAVRAS EM OUTRO IDIOMA.

A: adenina

abutment: conector transmucoso do implante

C: citocina

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleotídeo

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

et al.: e outros (abreviatura de *et alii*)

ϕ X174-RF *Hae* III DNA *digest*: padrão de massa molecular

G: guanina

IL: interleucina

MMP: metaloprotease

OD: densidade óptica

ON: durante a noite (*overnight*)

OD: odds ratio

pb: par(es) de base(s)

PCR: reação em cadeia da polimerase (“*polimerase chain reaction*”)

primer: oligonucleotídeo

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento(s) de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SNP: polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism*)

T: timidina

TBE: tampão tris-borato, para corrida de eletroforese

TE: Tris/EDTA

TIMP: proteínas inibidoras específicas de tecido (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TGF- β : fator de crescimento transformante – beta (“*tumor growth factor - β* ”)

U: unidade

μl: microlitros

RESUMO

Apesar do alto índice de sucesso dos implantes dentais osseointegrados, estudos demonstram que falhas podem ocorrer. O fenômeno em cacho, no qual alguns pacientes sofrem múltiplas perdas, suporta a evidência que a característica individual tem um papel importante na falha da osseointegração, entretanto pouco se sabe sobre a influência genética na susceptibilidade a perda precoce de implantes osseointegrados. Polimorfismos são variações genéticas encontradas na população, consideradas dentro da normalidade, que podem tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia. Polimorfismo em genes de mediadores inflamatórios (MMPs, TGFs e ILs) podem alterar a expressão dessas proteínas e estão relacionados a diversas patologias. O objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de polimorfismo em promotores dos genes que transcrevem a MMP-1 (-1607), MMP-9 (-1562), TGF- β_1 (-509 e -800) e IL-2 (-330) correlacionando-os com a perda precoce de implantes osseointegrados. Os voluntários foram divididos em dois grupos: *teste*, 28 pacientes com perda precoce de implantes e *controle*, 40 pacientes com implantes osseointegrados funcionais. O DNA obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal foi amplificado por PCR, digerido por RFLP e analisados por eletroforese. A análise estatística foi realizada através das Simulações de Monte Carlo, ao nível de significância de 5%. O programa ARLEQUIN foi utilizado para verificar combinações de haplótipos no gene do TGF- β_1 . Os resultados mostraram diferença nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da MMP-1 entre os dois grupos estudados ($p < 0.05$), sugerindo um papel ativo da MMP-1 na patogênese da falha de implante. Indivíduos com o alelo 2G parecem ter um risco três vezes maior a perder implante. Já os polimorfismos estudados no gene da MMP-9, do TGF- β_1 e da IL-2 não apresentaram frequência alélicas e genotípicas estatisticamente diferentes ($p > 0.05$) entre os dois grupos. Conclui-se que os polimorfismos no gene da MMP-9 (-1562), do TGF- β_1 (-509 e -800) e da IL-2 (-330) parecem não estar associados com a perda precoce de implantes osseointegrados, enquanto o polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 está fortemente associado com a falha na osseointegração e pode ser utilizado como marcador genético de risco a perda precoce de implantes osseointegrados.

ABSTRACT

Despite the long-term success of osseointegrated implants, failure remains inevitable. The cluster phenomenon—multiple implant failures in the same subject—supports the evidence that individual characteristics play an important role in the early failure process; however, little is known about the influence of genetic susceptibility on early implant failure. Gene polymorphism is a mechanism by which individuals may exhibit variations within the range of what is considered biologically normal. Some polymorphisms in mediator inflammatory genes (MMPs, TGFs and ILs) can alter the expression of these proteins and have been associated with several pathologies. The aim of this study was to investigate the relationship between functional polymorphisms in the MMP-1 (-1607), MMP-9 (-1562), TGF- β_1 (-509 and -800) and IL-2 (-330) genes and early implant failure. Subjects were divided into two groups: *test* (28 patients that suffered early implant failures) and *control* (40 patients with healthy and functional osseointegrated implants). Genomic DNA from oral mucosa was amplified by PCR, digested by RFLP, and analyzed by electrophoresis. Statistical analysis ($p < 0.05$) was made through Monte Carlo simulations. The ARLEQUIN program was used to determine haplotype frequencies in TGF- β_1 genes. Statistically significant difference was observed for allelic and genotype frequencies of the MMP-1 polymorphism between the two groups ($p < 0.05$), suggesting an active role of MMP-1 in implant failure. Individuals bearing 2G allele were three times more likely to lose an implant. No statistically significant differences were observed for the alleles and genotypes frequencies in the MMP-9, TGF- β_1 and IL-2 gene between the two groups ($p > 0.05$). In conclusion, polymorphisms in the MMP-9 (-1562), TGF- β_1 (-509 and -800) and IL-2 (-330) genes did not seem to be associated with early implant failure, while the polymorphism in the MMP-1 (position: -1607) gene is strongly associated with osseointegration failure and can be used as a genetic marker of risk for early osseointegrated implant failure.

INTRODUÇÃO

As evidências clínicas da osseointegração revolucionaram a implantodontia, tornando os implantes osseointegrados a alternativa mais estética e funcional para diversas situações de edentulismo. Apesar da osseointegração apresentar resultados previsíveis, reproduzíveis e estáveis ao longo do tempo (Pinto *et al.*, 2000), garantindo um alto índice de sucesso no tratamento com implantes (Adell *et al.*, 1990; Lekholm *et al.*, 1999), falhas ainda ocorrem.

O conceito de osseointegração foi desenvolvido por Branemark em meados de 1960 (Esposito *et al.*, 1998) e desde então várias definições foram propostas, incluindo a descrição da sobrevida clínica, avaliação da capacidade mecânica e aparência morfológica da interface implante-tecido (Branemark *et al.*, 1995). Do ponto de vista biológico, Branemark (1996) definiu a osseointegração como a presença de tecido ósseo neoformado em íntima aposição com a superfície do implante, sendo que ao nível de microscopia óptica não se deve observar interposição de tecido fibroso. Logo, é estabelecida uma conexão estrutural e funcional direta, capaz de suportar cargas fisiológicas normais sem que ocorra deformação excessiva ou rejeição. Portanto, é óbvio que a interação entre o tecido ósseo e a superfície do implante é o principal fator responsável pelo sucesso do tratamento com implantes osseointegrados.

O mecanismo de osseointegração é muito similar à cicatrização óssea primária. Dessa maneira, após o trauma cirúrgico ocorre um processo inflamatório, no qual uma cascata de mediadores promove alterações circulatórias e a formação de um hematoma. Em seguida, se estabelece uma regeneração, com formação de tecido ósseo. Numa terceira etapa, ocorre a maturação da ferida por mecanismo de remodelação óssea, o qual é influenciado pelas pressões oclusais (Cotran *et al.*, 1994).

Quando há uma regeneração adequada, se estabelece um contato direto entre a superfície de metal e o tecido ósseo. Alguns estudos observaram a interposição de fibras colágenas paralelas ao implante (McKinney *et al.*, 1988) originando o termo “fibro-osseo-integração” (Weiss, 1986). É importante salientar que essa interface é fisiologicamente bem tolerada e difere muito da presença de uma cápsula de tecido conjuntivo que a literatura associa à perda de implantes (Albrektsson *et al.*, 1991). A presença dessa cápsula se dá quando no lugar da regeneração acontece um processo de

reparo, no qual citocinas, como ILs e TGFs, orientam a migração e proliferação de fibroblastos culminando com a substituição do tecido de granulação, inicialmente formado, por uma cicatriz avascular composta por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e outros componentes da matriz extracelular (Cotran *et al.*, 1999). Essas citocinas ainda sinalizam para diversos tipos celulares estimulando a produção de prostaglandina e metaloproteases da matriz, as quais estão associadas à degradação de tecido ósseo e conectivo (Greenstein & Hart, 2002). Assim, na falha de implantes ocorre um processo de reparo, sendo que a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo promove a mobilidade do implante e conseqüentemente a necessidade de removê-lo.

A literatura (Askary *et al.*, 1999a; Askary *et al.*, 1999b; Pinto *et al.*, 2000) demonstra que diversos fatores podem estar associados com a falha de implantes osseointegrados, sendo classificados em exógenos (relacionados ao operador ou ao biomaterial) e endógenos (relacionados ao hospedeiro e subdivididos em locais ou sistêmicos). Forças oclusais excessivas e infecção (periimplantite) são os principais fatores associados à perda tardia, enquanto que o trauma cirúrgico excessivo, carga prematura e contaminação bacteriana estão relacionados à perda precoce (Esposito *et al.*, 1998; Ekfeldt, 2001). Alguns autores, ainda sugerem que o volume e a qualidade óssea são fatores fortemente associados a esse tipo de fracasso (Friberg *et al.*, 1991; Hutton, 1995). Entretanto, um pequeno número de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (Deas *et al.*, 2002), sugerindo uma incapacidade de cicatrização do hospedeiro.

A ocorrência de insucesso no tratamento com implantes parece não estar aleatoriamente distribuída na população; indivíduos que perderam um implante são mais propensos a sofrerem outras perdas (Weyant & Burn, 1993; Hutton *et al.*, 1995; Tonetti, 1998). Dessa maneira parece existir um grupo de risco, indicando que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrados. O desafio atual no tratamento com implante está na habilidade em detectar pacientes de risco. Dessa maneira, o conhecimento da etiologia e de fatores associados à falha de implante pode ajudar no reconhecimento desses pacientes e auxiliar o desenvolvimento de um tratamento adequado em conjunto com estratégias de prevenção.

REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente diversos sistemas de implantes osseointegrados são comercializados. Um dos mais bem estudados (Esposito *et al.*, 1998) é o Sistema Branemark, segundo o qual se preconiza a utilização de parafusos de titânio puro e a instalação do implante em duas etapas cirúrgica. Numa primeira etapa o parafuso de titânio é inserido no alvéolo previamente preparado e aguarda-se a osseointegração primária. Nesse período, 3-4 meses para maxila e 5-6 meses para mandíbula, recomenda-se uma relativa imobilidade na superfície implante-osso, visando favorecer o crescimento ósseo nos sulcos/ranhas do parafuso (Spiekermann *et al.*, 1995). Numa segunda etapa coloca-se a conexão transmucosa (*abutment*), a qual receberá a prótese logo após a cicatrização da mucosa (média de 15 dias).

A epidemiologia da falha de implantes que utilizam o *Sistema Branemark* já é bem determinada, sendo as perdas biológicas relativamente raras: 7.7% em 5 anos (Esposito *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1999). Sabe-se ainda que em pacientes edêntulos parciais a taxa de sucesso é maior que nos edêntulos totais (Esposito *et al.*, 1998). Essa diferença pode ser parcialmente explicada por uma distribuição de carga mais favorável. Além disso, estudos mostram que em edêntulos totais a falha na maxila é aproximadamente três vezes mais freqüente que na mandíbula, provavelmente devido ao diferente tipo ósseo encontrado nessas regiões (Esposito *et al.*, 1998).

A falha biológica dos implantes esta relacionada à incapacidade do hospedeiro em estabelecer ou manter a osseointegração e pode ser arbitrariamente dividida em **precoce**, quando a osseointegração não ocorre, e **tardia**, quando ocorre uma ruptura na estabilização da osseointegração. Entretanto, essa divisão apresenta limitações, uma vez que existe dificuldade clínica em determinar se a osseointegração realmente ocorreu (Esposito *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1999). Uma maneira prática de classificar a perda de implante é caracterizar como precoce aquela que ocorre antes da instalação da prótese e tardia aquela que acontece após o implante ser submetido a cargas oclusais (Espósito, 1999).

O sucesso clínico do implante não envolve somente sua permanência no sítio implantado, deve ainda incluir imobilidade quando não-conectado à prótese; ausência de radiolucidez periimplantar, ausência de sinais e sintomas persistentes e/ou

irreversíveis como dor, infecção, neuropatias, parestesia ou violação do canal mandibular; perda óssea vertical inferior a 0,2 mm anualmente após o primeiro ano em função; além de estar funcionalmente conectado à prótese (Smith & Zarb, 1989). Se algum desses critérios não é atingido o implante é considerado como “sobrevivente”, quando consegue exercer alguma função ou perdido, quando é necessário removê-lo.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS X IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS

No sítio de implantação, como qualquer sítio cirúrgico, ocorre uma reação inflamatória inicial em resposta ao trauma cirúrgico, entretanto, as características do material implantado podem influenciar essa resposta numa etapa posterior.

O titânio é um metal reativo que quando em contato com a atmosfera forma espontaneamente uma camada de óxido (TiO_2 , TiO , Ti_2O_3) que o torna muito resistente a ataques químicos, inclusive aos líquidos corporais. Essa camada de óxido influencia a adsorção protéica e celular na superfície do implante (Spiekermann *et al.*, 1995). Assim, o material do implante assume um papel fundamental no processo de osseointegração.

Sabe-se que imediatamente após a implantação forma-se uma camada de componentes orgânicos e inorgânicos do plasma em torno do implante (principalmente proteínas como fibronectina e albuminas), na qual se ligam células da resposta inflamatória e mesenquimais progenitoras. Essas células liberam e ativam diversas citocinas e fatores de crescimento que controlam a inflamação e estimulam a proliferação e diferenciação de células em osteoblastos e osteoclastos, além de sintetizar uma rede de colágeno que funciona como suporte para o processo de reparo (Schwartz *et al.*, 1997).

Foi demonstrado que os constituintes metálicos dos implantes podem estimular a produção de níveis aumentados de citocinas tornando exacerbada a resposta do hospedeiro (Perala *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1996; Tsutsui *et al.*, 1999). Durante a regeneração óssea as células próximas à superfície do implante parecem ter a capacidade de orquestrar a atividade das células mais afastadas do defeito ósseo, produzindo fatores relacionados à inflamação, bem como, estimulando o metabolismo ósseo e a deposição de matriz (Schwartz *et al.*, 1997). As características do material implantado influenciando a quantidade e variedade celular que se aderem ao implante

regem uma resposta imune que envolve diversos tipos celulares, como: macrófagos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e osteoclastos. Quando exacerbada essa resposta pode destruir o tecido periimplantar (Lekholm *et al.*, 1986; Seymour *et al.*, 1989). A ativação dessas células culmina com a síntese e liberação de citocinas (Dongari-Bagtzoglo *et al.*, 1998; Gainet *et al.*, 1998) e mediadores lipídicos (Salvi *et al.*, 1998), os quais participam do processo inflamatório e osteolítico.

Estudos prévios têm demonstrado que proteinases (Apse *et al.*, 1989; Aboyoussef *et al.*, 1998; Ingaman *et al.*, 1994; Teronen *et al.*, 1997) e citocinas (Kao *et al.*, 1995; Curtis *et al.*, 1997; Panagakos *et al.*, 1996; Salcetti *et al.*, 1997; Schierano *et al.*, 2000) estão presentes no fluido sulcular periimplantar e parecem ter um importante papel na patogênese da falha de implantes (Teronen *et al.*, 1997). A mensuração de mediadores inflamatórios pode monitorar o *status* de saúde do implante e auxiliar na compreensão da atividade de doença no tecido periimplante.

METALOPROTEASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

As metaloproteases da matriz (MMPs) compreendem uma família de enzimas que apresentam especificidade pelas macromoléculas da matriz extracelular. A família das metaloproteases é formada por pelo menos vinte membros em humanos que exibem similaridades estruturais e funcionais. As metaloproteases são secretadas na forma de zimógeno e como um complexo enzima-inibidor (Stricklin *et al.*, 1983; Emonard & Grimaud, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as metaloproteases é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com dois resíduos de histidina, presentes no domínio catalítico da molécula, tem importância crucial para o funcionamento adequado das metaloproteases (Souza *et al.*, 2000). Os dois átomos de cálcio conferem estabilidade à estrutura terciária da proteína (Dioszegi *et al.*, 1995).

As metaloproteases representam a maior classe de enzimas responsável pelo metabolismo da matriz extracelular (Kerrigan *et al.*, 2000), contribuindo para degradação e remodelação do colágeno de tecidos injuriados (Brikedal-Hansen, 1993). Elas são secretadas por células inflamatórias em resposta a estímulos como citocinas e lipopolissacarídeos (Brikedal-Hansen, 1993). As MMPs desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, como na involução pós-parto (Weeks *et al.*, 1976), na inflamação através da migração leucocitária (Knauper *et al.*, 1993), na osteoartrite (Vijaykumar *et al.*, 1995), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástase (Autio-Hermainen *et al.*, 1993), na doença periodontal (Souza *et al.*, 2003b) e na reabsorção óssea (Okada *et al.*, 1995).

As metaloproteases da matriz se organizam em três distintos e bem conservados domínios estruturais: pró-peptídios amino terminal, domínio catalítico e domínio Carboxi-terminal e apesar de possuírem grande semelhança estrutural apresentam diferentes subclasses, como: collagenases intersticiais, gelatinases, estromelisinases, MMP de membrana, além da matrilisina, metaloelastase e enamelisina. Esta classificação baseia-se na especificidade ao substrato (Kerrigan *et al.*, 2000).

As collagenases intersticiais foram as primeiras a serem descritas (Gross & Nagai, 1962) e durante as últimas décadas têm sido objeto de muitos estudos que versam sobre sua expressão, distribuição, estrutura química e molecular em processos normais e patológicos. Existem três tipos de collagenases até hoje descritas, que apesar de exibirem grande semelhança estrutural e de especificidade são codificadas por genes distintos. A do primeiro tipo, MMP-1 é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos (Brikedal-Hansen, 1993) e expressa amplamente entre os tecidos. Ela possui um proeminente papel na degradação do colágeno, pois é a única enzima capaz de clivar colágeno tipo I, II, III, VII, VIII e X, que são os mais abundantes componentes da matriz extracelular (Dunleavy *et al.*, 2000), tornando estas moléculas susceptíveis à ação de outras enzimas (Souza *et al.*, 1993). As collagenases intersticiais iniciam a reabsorção óssea pela geração de fragmentos de colágenos que ativam osteoclastos (Holliday *et al.*, 1997).

As gelatinases são capazes de degradar colágeno tipo IV e V, elastina e gelatina (colágeno desnaturado). Existe dois tipos de gelatinases já descrita, uma delas a

gelatinase B, MMP-9, é produzida por diversos tipos celulares como neutrófilos polimorfonucleares, queratinócitos e macrófagos, e, ocasionalmente, por fibroblastos. A MMP-9 tem um substrato específico, sendo particularmente ativo contra colágeno tipo IV (o maior componente da membrana basal) (Birkedal-Hansen, 1993). Ela também possui atividade proteolítica contra proteoglicanas e elastina (Birkedal-Hansen, 1993), além de remover fragmentos de colágeno desnaturados que sofreram ação de outras MMPs (Reponen *et al.*, 1994).

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteases ocorre a nível extracelular através de proteínas inibidoras específicas de tecido, os TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Herron *et al.*, 1986). Estes inibidores estão distribuídos pelos tecidos e fluidos e são secretados por diversos tipos celulares. Alterações nos níveis de síntese entre TIMPs e MMPs pode levar a um desequilíbrio na taxa de degradação da matriz extracelular, podendo causar destruição anormal da matriz (MacNaul *et al.*, 1990). Além disso, os genes que transcrevem as MMPs respondem em níveis de transcrição a diferentes citocinas (Fabunmi *et al.*, 1996, Kondapaka *et al.*, 1997). O Fator Transformador do Crescimento- β_1 (TGF- β_1) é aparentemente um dos mais importantes fator de crescimento regulador da síntese de MMPs em fibroblastos (Souza, 2000).

FATORES TRANSFORMADORES DO CRESCIMENTO

Os Fatores Transformadores do Crescimento (TGFs), são membros de uma grande família de fatores de crescimento e citocinas que são sintetizados por vários tipos celulares e distribuídos por diversos tecidos (Massagué, 1990). Eles representam uma família de polipeptídios homólogos que incluem cinco isoformas principais (Alberts *et al.*, 1997), sendo que o TGF- β_1 é o mais amplamente distribuído pelo organismo e possui sua sequência primária altamente conservada durante a evolução (Syrris *et al.*, 1998). Os TGF- β s são sintetizados como proteínas precursoras, que após sofrerem clivagem proteolítica, tornando-se ativas sobre a forma de duas cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto (Derynck *et al.*, 1985) liberando ainda componentes latentes (Munger *et al.*, 1997). Em contraste com a maioria dos outros polipeptídeos relacionados com o crescimento, o TGF- β atua como fator tanto inibidor quanto

estimulador (pró e antiinflamatório) (Pulley *et al.*, 2001). Seus efeitos dependem de sua concentração bem como do tipo celular em que está atuando. O TGF- β inibe o crescimento de células epiteliais em cultura, entretanto quando em baixa concentração é mitogênico para fibroblastos e células musculares lisas (Contran *et al.*, 1999).

O TGF- β_1 é uma proteína homodimérica produzida por uma variedade de tipos celulares, como plaquetas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos. Uma grande variedade de funções tem sido atribuída ao TGF- β_1 , incluindo a regulação na proliferação, diferenciação e migração celular (Massagué, 1990; Lácha *et al.*, 2001), participação da adesão celular (Wang *et al.*, 2000), angiogênese e imunossupressão (Mustoe *et al.*, 1987; Polvak, 1996). O TGF- β_1 é também conhecido por influenciar a regulação da produção da matriz extracelular induzindo a expressão de genes do colágeno (Polvak, 1996), além de reduzir a infecção e promover a cicatrização (Mustoe *et al.*, 1987). Estudos demonstram que o TGF- β_1 tem importante papel em diversas doenças como: câncer (Colletta *et al.*, 1991), esclerose sistêmica (Harrison *et al.*, 1991), fibrose pulmonar (Broekelmann *et al.*, 1999), osteoporose (Grainger *et al.*, 1999), arteroesclerose (Grainger *et al.*, 1995) e periodontite (Souza *et al.*, 2003a).

O TGF- β_1 é ainda conhecido por ter uma potente atividade imunossupressiva, regulando a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas e fator de necrose tumoral (Musso *et al.*, 1990). Além disso, ele atua como estimulante da atividade reparadora nos tecidos, inibindo a expressão, síntese e liberação de MMPs pelos fibroblastos, além de estimular a produção de TIMPs, que neutraliza a atividade dessas enzimas na matriz extracelular (Contran *et al.*, 1999). Apesar do TGF- β_1 ser considerado classicamente como um promotor de fibrose, alguns autores o classificam como um fator pró-inflamatório, uma vez que ele atua como um agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e linfócitos do sangue (Torre-Amione *et al.*, 1990).

O TGF é um componente central para o processo de remodelação óssea, porque inibe a formação e ativação de osteoclastos e induz a diferenciação de osteoblastos (Sun *et al.*, 1996). Além de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-8, que causam reabsorção óssea (Smith *et al.*, 1996).

INTERLEUCINAS

As interleucinas (ILs) constituem uma extensa família de citocinas que são produzidas por células hematopoéticas e atuam primariamente sobre os leucócitos. Elas são potentes moléculas imunomoduladoras que agem na inflamação e na resposta imune. As ILs possuem efeitos pleotrópicos atuando em muitos tipos celulares e medeiam seus efeitos por ligação a receptores de alta afinidade, específicos, nas células alvos (Cotran *et al.*, 1999).

A interleucina-2 (IL-2) foi o primeiro membro da família das interleucinas a ser sequenciado (Taniguchi *et al.*, 1983). Ela é uma glicoproteína produzida por linfócitos T *helper* e tem como uma das suas principais funções atuar como fator de crescimento dessas células (Wilson *et al.*, 1996). A IL-2 pode causar proliferação autócrina e parácrina das células T em locais de hipersensibilidade tardia (Cotran *et al.*, 1999). A IL-2 também está envolvida na ativação, proliferação e crescimento das células B (Wilson *et al.*, 1996) e na estimulação de macrófagos e células *natural killer* (Parkes *et al.*, 1998). Por ser uma importante citocina imunoreguladora, alterações na produção de IL-2 podem gerar condições patológicas no sistema imune (Matesanz *et al.*, 2001).

A partir de sua secreção, inicia-se uma ativação em cascata de diversas citocinas incluindo outras interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral, com efeitos sinérgicos ou inibitórios sobre sua própria atividade. Assim a IL-2 tem ação tanto pró-inflamatória (Tew *et al.*, 1989), quanto antiinflamatória (Kikuchi *et al.*, 2002). A IL-2 já foi associada a diversas doenças inflamatórias como: colite ulcerativa (Parkes *et al.*, 1998), esclerose múltipla (Matesanz *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 2002) e doença periodontal (Scarel-Caminaga *et al.*, 2002). O aumento na produção de IL-2 foi associado a eventos de rejeição aguda (Cox *et al.*, 2001).

A IL-2 também tem sido implicada na estimulação da atividade de osteoclastos durante reabsorção óssea (Ries *et al.*, 1989, Ogata *et al.*, 1999). E parece modular a expressão de importantes citocinas envolvidas na reabsorção óssea (Thomson *et al.*, 1986, Thomson *et al.*, 1987), como a IL-1 (Mier *et al.*, 1987) e o Fator de Necrose Tumoral (Nedwin *et al.*, 1985).

POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Polimorfismos são pequenas variações genéticas encontradas em mais de 1% da população e consideradas biologicamente normais. Geralmente os polimorfismos são caracterizados por uma simples troca de nucleotídeos (*single nucleotide polymorphisms* - SNP), porém podem ser representados por deleções ou inserções de bases. Os polimorfismos são considerados funcionais quando promovem alterações na expressão do gene e dessa forma podem tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia (Thompson *et al.*, 1991).

O gene da MMP-1 está localizado no cromossomo 11q22.3 (Gene ID 4312), um polimorfismo caracterizado pela inserção de uma base guanina (G) na posição -1607 desse gene, cria dois alelos diferentes (1G ou 2G), sendo que o alelo 2G tem sido relacionado com o aumento da expressão desse gene (Rutter *et al.*, 1998). A presença desse alelo está associada com o desenvolvimento de câncer ovariano (Kanamori *et al.*, 1999), carcinoma endotelial (Nishioka *et al.*, 2000), densidade óssea (Yamada *et al.*, 2002), ruptura prematura da membrana fetal (Fujimoto *et al.*, 2002), risco de metástase (Autio-Hermainen *et al.*, 1993) e diversas doenças inflamatórias, inclusive com a severidade da doença periodontal (Souza *et al.*, 2003b).

O promotor do gene da MMP-9, localizado no cromossomo 20q11.2-q13.1 (Gene ID 4318), apresenta uma substituição de uma citosina por uma timina na posição -1562. Esse polimorfismo tem um importante papel na regulação da MMP-9 aumentando sua expressão (Zhang *et al.*, 1999). Franchi *et al.* (2002) mostraram uma correlação positiva entre o aumento da MMP-9 e carcinoma de cabeça e pescoço. Esse polimorfismo também parece estar relacionado com o risco aumentado de doença da artéria coronária (Zhang *et al.*, 1999), além de estar envolvido na reabsorção óssea (Okada *et al.*, 1995).

O cromossomo 19q13.1 (Gene ID7040) contem o gene do TGF- β_1 e já foram descritos sete polimorfismos nesse gene (Cambien *et al.*, 1996). Entre eles uma troca de uma citocina por uma timina, na posição -509, e uma troca de adenina por guanina na posição -800, mostraram interferir com a transcrição desse gene (Hobbs *et al.*, 1998, Syrris *et al.*, 1998). Esses dois loci polimórficos podem ser analisados separadamente ou em combinação haplotípica. Muitas vezes não se detecta a influencia de um único sítio polimórfico, entretanto quando analisado o haplótipo de diferentes polimorfismos,

alelos herdados em combinação podem influenciar uma determinada patologia. Tais polimorfismos estão associados à asma (Pulley *et al.*, 2001) e alergia, promovendo o aumento dos níveis de imunoglobulina-E. O polimorfismo C-509T ainda está associado à densidade óssea mineral (Yamada *et al.*, 2001). O SNP T-509C, parece também ter um efeito na modulação do processo de inflamação durante a doença periodontal (Souza *et al.*, 2003).

O gene da IL-2 está localizado no cromossomo 4q26-q27 (Gene ID 3558). Na região promotora desse gene, mais especificamente -330 pb antes do início do sítio de transcrição, há um polimorfismo que gera dois alelos: T ou G, sendo indicado como marcador genético útil em estudos de correlação com patologias (John *et al.*, 1998). Recentemente foi comprovado o envolvimento desse polimorfismo com a severidade da doença periodontal (Scarel-Caminaga *et al.*, 2002).

PROPOSIÇÃO

Polimorfismos na região do promotor da MMP-1, MMP-9, TGF- β_1 e IL-2 já foram descritos por alguns autores (Rutter *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Hobbs *et al.*, 1998; John *et al.*, 1998), sendo encontrada correlação entre esses polimorfismos e certas patologias que afetam a matriz extracelular.

Uma vez que as metaloproteases da matriz desempenham um papel fundamental na destruição tecidual e que TGF- β_1 e IL-2 participam ativamente da reabsorção óssea, julgamos interessante o estudo de polimorfismos nos promotores destes genes em pacientes que apresentaram perda precoce de implantes osseointegrados.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de polimorfismo em promotores dos genes que transcrevem a MMP-1 (-1607), MMP-9 (-1562), TGF- β_1 (-509 e -800; separadamente e em haplótipo) e IL-2 (-330) correlacionando-os com a perda precoce de implantes osseointegrados.

MATERIAL E MÉTODO

CASUÍSTICA

A obtenção do material foi realizada mediante consentimento do grupo amostral, após breve explanação dos objetivos do estudo, segundo as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa (006/02) (Anexo 1). Um total de 193 implante distribuídos entre 68 pacientes em bom estado de saúde geral e com idade entre 18 e 73 anos fizeram parte desse estudo, sendo divididos em dois grupos.

Grupo Teste: 28 pacientes que sofreram perda precoce de implantes osseointegrados (implantes perdidos antes da colocação da prótese).

Grupo Controle: 40 pacientes que obtiveram sucesso no tratamento com implantes osseointegrados (implantes com carga funcional a pelo menos 1 ano, sem mobilidade ou sintomatologia).

As características dos pacientes podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos pacientes

Parâmetros	Grupo Controle (n=40)	Grupo Teste (n=28)
Media de idade	42.9 / 21-71	50.3 / 18-73
Gênero		
Feminino	57.5% (23/40)	53.5% (15/28)
Masculino	42.5% (17/40)	46.5% (13/28)

Pacientes de ambos os grupos foram selecionados em clínicas, cujas taxas de insucesso para o tratamento com implantes são menores que 5%, condizendo com o aceito pela literatura (Esposito *et al.*, 1998):

- Clínica de Especialização em Implantodontia da FOP-UNICAMP

Av Limeira, 901 – Areião, Piracicaba-São Paulo, cujo coordenador é o Prof. Dr. Renato Mazzonetto.

- Centro de Odontologia Especializada Meneghel

Rua do Rosário, 212 – Centro, Piracicaba-São Paulo, sendo o profissional responsável o Dr. Ataulpa Meneghel.

- Centro de Implantodontia Oral – Cênior

Rua Almeida Garret, 57 – Itaigara, Salvador-Bahia, sendo o profissional responsável o Dr. Fábio Bezerra.

Critérios para Exclusão de Pacientes

No intuito de diminuir a influência de fatores sistêmicos na perda do implante, foram excluídos do estudo pacientes fumantes, diabéticos, portadores de osteoporose, pacientes imunodeprimidos ou com história de exposição prévia à radioterapia ou quimioterapia. Foram ainda excluídos implantes submetidos à carga protética prematura; pacientes que apresentarem intercorrência pós-operatória, como infecção, e pacientes que se submeterem a técnicas regenerativas prévias ou concomitantes à instalação dos implantes, como enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada. Essas informações foram obtidas através da ficha clínica de cada paciente, sendo de responsabilidade do cirurgião dentista a coleta das mesmas, antes do procedimento cirúrgico, durante anamnese.

Critérios Determinantes de Falha dos Implantes

Tratando-se de um estudo retrospectivo, os pacientes que sofreram insucesso com o tratamento, perderam implantes durante o período cicatricial inicial, compreendido entre o momento de inserção do implante até o momento de instalação da prótese, ou seja, esses implantes não foram submetidos a cargas protéticas, sendo reconhecidos como implantes de perda precoce. Os implantes foram considerados perdidos nos casos de falência por mobilidade, radiolucidez periimplantar, dor ou presença de fibrose interfacial, sendo imediatamente removidos.

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Obtenção de DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de um bochecho com 5 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos, juntamente com uma leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterelizada. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA. Esta solução foi imediatamente levada ao laboratório para a execução de uma centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm, para coleta da fase celular. Para a suspensão das células, acrescentou-se 500 µl de tampão de extração (Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), EDTA a 5 mM e SDS a 0,5%) e as amostras eram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

Extração de DNA

Depois de descongeladas as amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 100 ng/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) a 56°C. O DNA foi então purificado com três extrações sucessivas com fenol/clorofôrmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com acetato de sódio a 2,5 M (pH 5,2) e etanol (Maniatis *et al.*, 1989). O DNA foi ressuspenso em 50 µl de tampão TE (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente, ON. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator-*Pharmacia-Biotech*) e sua pureza estimada pela razão OD 260/280 (Maniatis *et al.*, 1989).

Reação da PCR e RFLP

Reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram utilizadas para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1, MMP-9, TGF- β_1 e IL-2. A reação possuía um volume final de 50 µl contendo aproximadamente 500 ng de DNA, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, MgCl₂ a 1.5mM, desoxirribonucleotídeos (200 µM de cada), *primers* específicos para cada fragmento e 1U de Taq polimerase

(Amersham *Pharmacia-Biotech*, Uppsala, Sweden). Uma mistura com todos os reagentes, porém sem a Taq polimerase, era submetida a uma desnaturação inicial por 1 a 5 minutos. Após ser acrescentado a Taq polimerase foram utilizados trinta e cinco ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a uma temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72°C. Em seguida estes fragmentos foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores (RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A digestão foi realizada com volume final de 10 µl, por 16 h. Para o gene da IL-2, antes da digestão, dois produtos de amplificação (100 µl de PCR) foram precipitados em acetato de sódio a 2,5 mM (pH 5,2) e etanol (Maniatis *et al.*, 1989) e ressuspenso em 20 µl de água destilada. Os *primers*, temperatura de anelamento (amplificação), enzimas de restrição e temperatura de digestão, além do tamanho dos fragmentos gerados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Informações sobre condições das reações de PCR e RFLP.

<i>SNP</i>	<i>Primer (5' – 3')</i>	Anelamento (PCR)	Enzima Restrição	Fragmentos (pb)
MMP-1 (-1607)	F*: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT R**: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	55°C (30 seg.)	<i>Xmn</i> I (37°C)	118 89 + 29
MMP-9 (-1562)	F: GCCTGGCACATAGTAGGCCC R: CTCCTAGCCAGCCGGCATC	65°C (45 seg.)	<i>Pae</i> I (37°C)	435 247 + 188
TGF-β₁ (-509)	F: TTTTGCCATGTGCCCAGTAG R: CACCAGAGAAAGAGGACCAG	58°C (1 min.)	<i>Eco</i> 81I (37°C)	740 551 + 189
TGF-β₁ (-800)	F: CCCGGCTCCATTTCAGGTG R: TGCTCTTGACCACTGTGCCA	62°C (1 min.)	<i>Mae</i> III (55°C)	388 325 + 63
IL-2 (-330)	F: TATTCACATGTTTCAGTGTAGTTCT R: CATTGTGGCAGGAGTTGAGGT	56°C (1 min.)	<i>Mae</i> I (45°C)	410 374 + 26

* Primer Forward ** Primer Reverse

Eletroforese

As seqüências amplificadas (PCR) assim como os fragmentos submetidos à restrição (RFLP) foram analisados por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). Dez microlitros de DNA amplificado ou digerido foram adicionadas a 2 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30% em água) para eletroforese. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 20 mA, sendo o tempo de corrida variável de acordo com o tamanho do fragmento. Utilizou-se como padrão o marcador de massa molecular ϕ X174-RF *Hae*III DNA *digest* (1 µl em 5 µl de água e 2 µl de tampão de amostra). Para visualização das bandas de DNA os géis foram corados pelo método de rápida coloração pela prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Análise Estatística dos Resultados

A associação entre polimorfismos genéticos e o grau de predisposição a perda precoce de implantes osseointegrados foram avaliados através das Simulações de Monte Carlo, ao nível de significância de 5%. O programa ARLEQUIN (v. 2.0 – Schneider *et al.*, 2000) foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e combinações de haplótipos (exclusivamente para os loci no gene do TGF- β_1). Para analisar as frequências dos haplótipos do gene do TGF- β_1 foi utilizado o programa Clump.

RESULTADOS

Os polimorfismos nos genes da MMP-1 (1607), MMP-9 (-1562) e TGF- β_1 (-509 e -800) apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg, garantindo assim que a distribuição genotípica ocorreu ao acaso. Já no gene da IL-2 a população estudada não apresentou o equilíbrio esperado devido à alta frequência de indivíduos heterozigotos e a ausência do genótipo T/T. Esse genótipo realmente é muito raro e o tamanho da nossa amostra poderia explicar sua ausência.

Analisando-se a idade, gênero dos indivíduos e porcentagem de implantes realizados na maxila ou mandíbula, não houve diferença estatística significativa ($p>0.05$) entre os grupos estudados (tabela 3).

Tabela 3: Média de idade, frequência de gênero dos indivíduos e porcentagem de implantes em cada região.

Parâmetros	Grupo Controle (n=40)	Grupo Teste (n=28)
Média de idade	42.9 / 21-71	50.3 / 18-73
Gênero		
Feminino	57.5% (23/40)	53.5% (15/28)
Masculino	42.5% (17/40)	46.5% (13/28)
Implantes		
Maxila	44.7% (43/96)	41.3% (40/97)
<i>anterior</i>	<i>65.1% (28/43)</i>	<i>50.0% (20/40)</i>
<i>posterior</i>	<i>34.9% (15/43)</i>	<i>50.0% (20/40)</i>
Mandíbula	55.3% (53/96)	58.7% (57/97)
<i>anterior</i>	<i>22.6% (12/53)</i>	<i>24.6% (14/57)</i>
<i>posterior</i>	<i>77.4% (41/53)</i>	<i>75.4% (43/57)</i>

A avaliação das características clínicas do grupo teste revelou que 67.8% (19/28) foram perdidos antes da instalação do *abutment* e que a região posterior da mandíbula concentrou o maior número de falhas (54.8%) quando comparada às demais regiões da boca (tabela 4).

Tabela 4: Implantes perdidos conforme tempo de colocação de *abutment* e posição no arco (região).

Porcentagem de implantes perdidos	
Antes da instalação do <i>abutment</i>	67.8% (19/28)
Após a instalação do <i>abutment</i>	32.2% (09/28)
Região	
Maxila anterior	19.0% (08/28)
Maxila posterior	09.5% (04/28)
Mandíbula anterior	16.7% (07/28)
Mandíbula posterior	54.8% (23/28)

Para o polimorfismo no gene da MMP-1 foram analisados 26 pacientes controles e 20 pacientes que sofreram perda precoce de implante osseointegrado (teste); já para análise dos demais polimorfismos aqui estudados todos os 68 pacientes foram investigados, ou seja, 40 indivíduos no grupo controle e 28 indivíduos no grupo teste.

MMP-1

O polimorfismo estudado no gene da MMP-1 se caracteriza por apresentar dois alelos diferentes (1G ou 2G) na posição -1607. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e genótipos do gene da MMP-1 entre o grupo controle e grupo teste. No grupo controle o alelo 2G foi encontrado em 25% dos pacientes, enquanto no grupo teste esse mesmo alelo estava presente em 50% dos pacientes ($p=0.013$). Indivíduos com o alelo 2G parecem ter um risco três vezes maior a perder implante ($p=0.0239$, $OR=3.0$, $95\% IC=1.24-7.24$). O genótipo 1G/1G foi observado em 61,5% do grupo controle, enquanto todos os pacientes do grupo teste apresentaram genótipo 1G/2G ($p= 0.00$). A frequência alélica e genotípica do gene da MMP-1 esta mostrada na tabela 5.

Tabela 5. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-1.

MMP-1	Grupo Controle		Grupon Teste		Valor de p	OR
	n	%	n	%		
-1607						
Alelos	n = 52		n = 40			
G	39	75	20	50	(Clump)	3.0
GG	13	25	20	50	$p=0.01$	
Genotipos	n = 26		n = 20			
G/G	16	61.5	00	00.0	(Clump)	
GG/GG	03	11.5	00	00.0	$p=0.000$	
G/GG	07	13.5	20	100.0		

MMP-9

O polimorfismo da posição -1562 do gene do MMP-9 pode apresentar duas bases diferentes: alelo T ou C. Nesse estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e dos genótipos entre os grupos teste e controle. O alelo C foi o mais frequente, sendo encontrado em 88.75% do grupo controle e 94.65% do grupo teste ($p=0.35$). O genótipo C/C foi observado em 77.5% do grupo controle e 89.3% do grupo teste ($p=0.17$), sendo que o genótipo T/T não foi observado em nenhum dos dois grupos. A frequência dos diferentes alelos e genótipos desse polimorfismo pode ser observada na tabela 6.

Tabela 6. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-9.

MMP-9	Grupo Controle		Grupon Teste		Valor de p
	n	%	n	%	
-1562					
Alelos	n = 80		n = 56		
T	09	11.25	03	05.35	(Clump)
C	71	88.75	53	94.65	$p=0.35$
Genotipos	n = 40		n = 28		
T/T	00	00.0	00	00.0	(Clump)
C/C	31	77.5	25	89.3	$p=0.33$
T/C	09	22.5	03	10.7	

TGF- β_1

O gene do TGF- β_1 não apresentou diferença estatística na frequência alélica e genotípica entre os grupos em relação aos dois fragmentos estudados. Na posição -509, troca de um alelo C pelo alelo T, o alelo C foi o mais freqüente em ambos os grupos estudados ($p=0.71$) e o genótipo heterozigoto estava presente em mais de 50% dos pacientes (0.94). No sitio -800, alelo G ou A, o alelo G foi observado com uma frequência muito similar nos dois grupos ($p=0.82$) e o genótipo mais freqüente foi o G/G ($p=0.64$) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene do TGF- β_1 .

TGF- β_1	Grupo Controle		Grupon Teste		Valor de p
	n	%	n	%	
-509					
Alelos	n = 80		n = 56		
C	49	61.3	36	64.2	(Clump)
T	31	38.7	20	35.8	p=0.87
Genotipos	n = 40		n = 28		
C/C	14	35.0	11	39.3	(Clump)
T/T	05	12.5	03	10.7	p=0.94
C/T	21	52.5	14	50.0	
-800					
Alelos	n = 80		n = 56		
G	71	88.7	49	87.5	(Clump)
A	09	11.3	07	12.5	p=1.00
Genotipos	n = 40		n = 28		
G/G	31	77.5	22	78.5	(Clump)
A/A	00	00.0	01	03.5	p=0.64
G/A	09	22.5	05	18.0	

A distribuição dos haplótipos em alelos e genótipos foi semelhante nos dois grupos estudados ($p=0.94$ e $p=0.78$ respectivamente), onde o haplótipo mais freqüente o CG (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos haplótipos em alelos e genótipos do gene do TGF- β_1 .

Haplotipos	Grupo Controle		Grupo Teste		Valor de p
C-509T/ G-800^a	n	%	n	%	
Haplotipo (Alelo)					
CG	41	51.3	29	51.8	(Clump)
CA	08	10.0	07	12.5	$p=0.94$
TG	30	37.5	20	35.7	
TA	01	1.25	00	00.0	
Haplotipo (Genotipo)					
CG/CG	08	20.0	08	28.6	(Clump)
CA/CA	00	00.0	01	03.6	$p=0.78$
TG/TG	04	10.0	03	10.7	
CG/CA	06	15.0	02	07.1	
CG/TG	19	47.5	11	39.3	
CA/TG	02	05.0	03	10.7	
TG/TA	01	02.5	00	00.0	

IL-2

O polimorfismo do gene da IL-2 pode apresentar o alelo T ou G na posição -330. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as frequências alélicas e genotípicas dos dois grupos. O alelo T foi observado em 58.3% do grupo controle e 67.3% do grupo teste ($p=0.28$). O genótipo T/G foi encontrado em 83.3% no grupo controle e 65.4% no grupo teste ($p=0.08$). As frequências alélicas e genotípicas do gene da IL-2 podem ser observada na tabela 8.

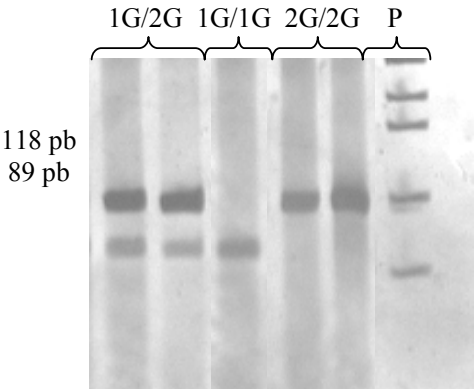
Tabela 8. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da IL-2.

IL-2	Grupo Controle		Grupon Teste		Valor de p
	n	%	n	%	
-330					
Alelos	n = 80		n = 56		
T	42	58.3	35	67.3	(Clump)
G	30	41.7	17	32.7	$p=0.31$
Genotipos	n = 40		n = 28		
T/T	06	16.7	09	34.6	(Clump)
G/G	00	00.0	00	00.0	$p=0.13$
T/G	30	83.3	17	65.4	

As figuras seguintes mostram os fragmentos amplificados e digeridos por uma das cinco enzimas de restrição empregadas neste estudo, correspondendo aos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1 (-1607), MMP-9 (-1562), TGF- β_1 (-509) e (-800) e IL-2 (-330), respectivamente.

Figuras de géis de poliacrilamida corados pela prata evidenciando resultado da RFLP.

MMP-1 (-1607)



Legenda:

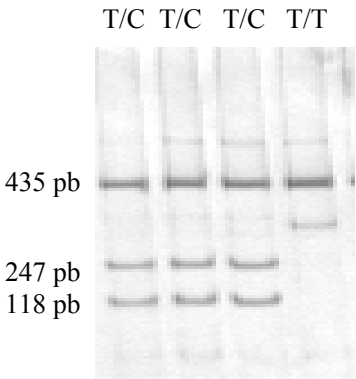
1G/2G = paciente heterozigoto

1G/1G = paciente homozigoto para o alelo G

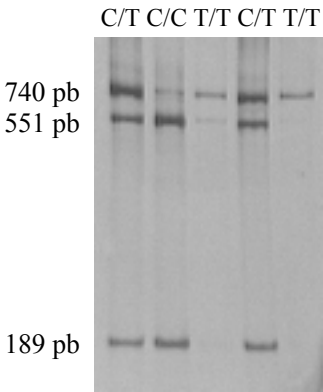
2G/2G = paciente homozigoto para o alelo GG

6 = marcador de massa molecular ϕ X174-RF *Hae*III DNA digest

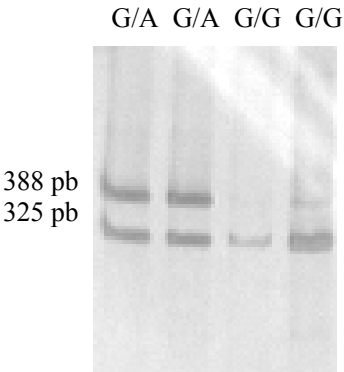
MMP-9 (-1562)



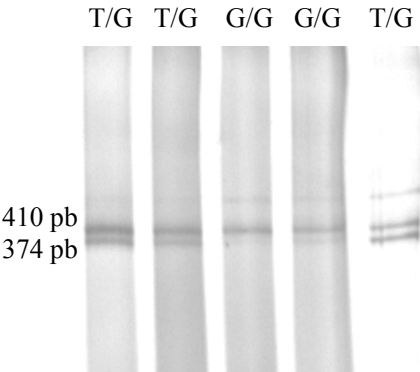
TGF- β_1 (-509)



TGF- β_1 (-800)



IL-2 (-330)



DISCUSSÃO

Diversos fatores estão associados com a falha de implantes osseointegrados (Askary *et al.*, 1999a; Askary *et al.*, 1999b; Pinto *et al.*, 2000), no entanto, muitos pontos remanescem sem esclarecimento, principalmente quando se trata da perda precoce. O fenômeno em cacho, no qual alguns pacientes sofrem múltiplas perdas, suporta a evidência que a característica individual tem um papel importante na falha do implante. Dessa maneira, fatores como: fumo (Gorman *et al.*, 1994; Lindquist *et al.*, 1997; Wilson & Nunn, 1999), quantidade e densidade ósseas (Jaffin & Berman, 1991; Bryant, 1998; Stanford, 1999), diabetes (Shernoff *et al.*, 1994; Abdulwassie & Dhanrajani, 2002), tratamento quimioterápico (Schon *et al.*, 1996) e resposta imune debilitada (Kronstrom *et al.*, 2000), interferem no processo de osseointegração.

Alguns autores (Salonen *et al.*, 1993) ainda associam a perda precoce de implantes à idade avançada do paciente. Nesse estudo não foi observada influência da idade ou gênero sobre a osseointegração, concordando com a maioria dos achados na literatura (Ekfeldt *et al.*, 2001; Hutton *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1998).

Outro fator relacionado à perda de implante é a intensidade da força aplicada na segunda etapa cirúrgica durante a instalação do transmucoso (*abutment*). Estudos demonstram que a força excessiva nessa etapa pode provocar a ruptura de uma frágil interface osso-implante (Friberg *et al.*, 1991; Askary *et al.*, 1999a). Entretanto, em nosso estudo a grande maioria das perdas ocorreu antes da instalação do *abutment*, indicando que a intensidade da força aplicada durante sua colocação não foi importante nas perdas dos implantes na população estudada.

Como a maioria dos implantes perdidos estava localizada na região posterior da mandíbula, poder-se-ia suspeitar que o volume e densidade óssea nessa região tenham desempenhado algum papel na falha dos implantes, de acordo com os estudos de Friberg *et al.* (1991) e Hutton (1995). A camada cortical da mandíbula geralmente é densa e espessa e tende a se tornar mais estreita e porosa na região posterior. Somado a esse fato, a presença do canal mandibular também limita o volume ósseo deste local. Entretanto, a grande porcentagem de implantes na região posterior encontrada em nosso grupo controle, sugere que o volume e a densidade óssea apenas não foram fatores

causadores da perda de implantes; devendo existir fatores mais determinantes na falha da osseointegração.

Apesar dos esforços para eliminar ou minimizar fatores conhecidos de risco à perda de implante, falhas sem causas clinicamente reconhecidas ainda ocorrem. Tendo em vista que a diferenciação e função de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) são dependentes de fatores locais e da expressão de mediadores inflamatórios como: TGF, IL e MMP (Roodman, 1997a), torna-se válido avaliar a influência de fatores genéticos, que possam causar uma maior expressão desses mediadores, na falha do estabelecimento da osseointegração.

Foram relatados polimorfismos em genes de MMPs, TGFs e ILs que estão relacionados com a hipersecreção dessas proteínas (Rutter *et al.*, 1998; Hobbs *et al.*, 1998; Syrris *et al.*, 1998; John *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999) e associados à diversas doenças inflamatórias (Matesanz *et al.*, 2001; Pulley *et al.*, 2001; Lamblin *et al.*, 2002), inclusive a doença periodontal (Scarel-Caminga *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2003b; Trevilatto *et al.*, 2003).

Wilson e Nunn (1999) não encontraram associação entre polimorfismos em genes da IL-1 (IL-1A -889 e IL-1B +3953) e a perda de implantes. Entretanto, a presença de pacientes fumantes nesse estudo pode ter mascarado a influência genética, uma vez que se sabe que o fumo é um forte fator de risco para perda de implantes – fumantes tem um risco três vezes maior de perder implantes quando comparados a não fumantes (Esposito *et al.*, 1998). ROGERS *et al.* (2002), avaliando falhas tardias, também não encontraram associação significativa entre o genótipo da IL-1A (-889) e da IL-1B (+3953) e a perda de implantes, porém não ficou claro se a perda de implante ocorreu por fatores biológicos ou mecânicos. Recentemente, foi demonstrado que o genótipo da IL-1 somente não apresenta risco para perda óssea peri-implantar, mas o risco pode aumentar significativamente quando esse genótipo está associado ao fumo (Feloutzis *et al.* 2003). Shimpuku *et al.* (2003) demonstrou correlação significativa entre o polimorfismo C-511T no gene da IL-1B e perda óssea ao redor de implantes, comprovando a influência das características genéticas na falha da osseointegração.

Esse estudo mostrou que o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-1 (posição -1607) está fortemente associado à perda precoce de implantes osseointegrados em pacientes não fumantes. O alelo 2G foi observado numa frequência

muito maior no grupo teste (pacientes com perda precoce de implante). Esse alelo aumenta a transcrição do gene e potencializa o nível da expressão dessa proteína (Rutter *et al.*, 1998) fornecendo a base molecular para explicar a intensa degradação da matriz extracelular e justificar o aumento na susceptibilidade a falha na osseointegração. Esse polimorfismo também está associado à susceptibilidade a periodontite crônica na população brasileira (Souza *et al.*, 2003b).

Os demais polimorfismos estudados C-1562T no gene da MMP-9, C-509T e G-800A no gene do TGF- β_1 e T-330G no gene da IL-2 não foram associados à falha precoce de implantes osseointegrados. Uma possível explicação poderia ser o tamanho da amostra, uma vez que nossos dados se referem a 68 pacientes, o que fornece um moderado poder para detectar pequenas influências na relação entre polimorfismos e patologias. Nesse estudo rígidos critérios de inclusão de voluntários foram adotados no intuito de minimizar a influência de outros fatores como fumo, complicações cirúrgicas ou debilitações sistêmicas do paciente, e assim, avaliar o papel “isolado” dos polimorfismos na perda do implante. Essa restrita seleção dos pacientes associada à baixa taxa de perda de implante osseointegrados limitou o tamanho amostral.

Evidências experimentais obtidas *in vitro* mostraram que o polimorfismo C-1562T no gene da MMP-9 aumenta expressão dessa proteína. Da mesma maneira, foi demonstrado que existe um componente genético no controle da concentração de TGF- β_1 na circulação (Grainger *et al.*, 1997). Em particular, os dois polimorfismos aqui estudados, na região promotora do gene do TGF- β_1 (C-509T e G-800A), estão significativamente associados à concentração plasmática dessa proteína (Grainger *et al.*, 1999a). O efeito do polimorfismo no gene da IL-2 na expressão da proteína ainda não foi claramente documentado na literatura (John *et al.*, 1998, Reynard *et al.*, 2000), entretanto, estudos *in vitro* mostram que esse polimorfismo influencia a produção de níveis aumentados de IL-2 em linfócitos do sangue periférico (Hoffmann *et al.*, 2001).

Esses polimorfismos, apesar de modificarem a expressão das respectivas proteínas, parecem não influenciar ou ter somente um efeito mínimo na falha de implantes osseointegrados. Outra explicação seria que esses polimorfismos podem ter seus efeitos mascarados por polimorfismos em diferentes regiões do mesmo gene ou em outros genes que participam da complexa rede de mediadores inflamatórios da região

periodontal. Dessa maneira, somente a presença desses polimorfismos não é um fator de risco genético para perda precoce de implantes.

Entretanto, a investigação desses polimorfismos deve ser considerada na falha de implantes, devido à importância dessas proteínas no processo de inflamação e reabsorção óssea que são os eventos mais importantes na falha de implantes. Apesar dos polimorfismos no gene do TGF- β_1 (C-509T) e da IL-2 (T-330G) estarem associado à doença periodontal, o impacto desses genótipos no mecanismo inflamatório gerado durante a doença periodontal parece não ser tão significativo no processo inflamatório da osseointegração.

Esses resultados não significam ausência de influência genética sobre a osseointegração. Na verdade, os polimorfismos genéticos provavelmente influenciam a osseointegração através do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, assim um polimorfismo pode ter seus efeitos acentuados ou mascarados por outro polimorfismo. Para entender a importância de cada alelo polimórfico é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (Adamo *et al.*, 2001).

É importante salientar que os resultados aqui reportados poderiam ser diferentes quando analisados em populações etnicamente distintas, uma vez que, a origem étnica pode influenciar a frequência alélica (Mourant *et al.*, 1976) e é identificada como um fator significativo em diversas patologias.

A descoberta de marcadores genéticos relacionados à perda precoce de implantes possibilita a identificação de indivíduos susceptíveis ao insucesso e uma melhor compreensão do processo de osseointegração. Isso é de um valor clínico inestimável, uma vez que, uma seleção mais criteriosa poderia ser realizada e, no futuro, estratégias de prevenção e terapêutica individualizada poderiam ser desenvolvidas, visando modular a expressão de mediadores inflamatórios e dessa maneira aumentar a taxa de sucesso dos implantes.

CONCLUSÕES

- O polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 está associado com perda precoce de implantes osseointegrados na população estudada. Os resultados apresentados sugerem um papel ativo da MMP-1 na patogênese da falha de implante, onde indivíduos com o alelo 2G parecem ter um risco três vezes maior a perder implante.
- Os polimorfismos estudados no gene da MMP-9 (-1562) parecem não estar associados com a perda precoce de implantes osseointegrados do TGF- β_1 (-509 e -800) e da IL-2 (-330), não sendo bons marcadores genéticos de susceptibilidade a falha na osseointegração.
- A combinação haplotípica dos polimorfismos -509 e -800 do gene do TGF- β_1 parecem não estar associados com a perda precoce de implantes osseointegrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Editora Artes Médicas Sul LTDA. São Paulo. 1997.
2. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. **Implant Dent**. 2002; 11: 83-68.
3. Aboyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1998; 13: 689-696.
4. Adamo CT, Mailhot JM, Smith AK, Borke JL. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. **J Oral Implantol**. 2001; 27: 25-31.
5. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1990; 5: 347-359.
6. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. **J Clin Periodontol**. 1991; 18: 474-481.
7. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. **J Periodontal Res**. 1989; 24: 96-105.
8. Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part I. **Implant Dent**. 1999a; 8: 173-185.
9. Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part II. **Implant Dent**. 1999b; 8: 265-277.
10. Autio-Harminen H, Karttunen T, Hurskainen T, Hoyhtya M, Kauppila A, Tryggvason K. Expression of 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. **Lab Invest**. 1993; 69: 312-321.
11. Branemark P-I, Lausmaa J, Ericson L, Thomsen P, Branemark R, Skalak R. Anatomy of osseointegration and the transfer of load. In: Fonseca RJ, Davis WH. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery**. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995. p. 165-224.

12. Branemark R. **A biomechanical study of osseointegration.** In-vivo measurements in rat, rabbit, dog and man. Göteborg: Göteborg University, 1996.
13. Brikedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol.** 1993; 64: 474-484.
14. Broekelmann T.J., Limper A.H., Colby T.V. & McDonald J.A. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999; 88: 6642-6646.
15. Bryant SR. The effects of age, jaw site, and bone condition on oral implant outcomes. **Int J Prosthodont.** 1998; 11: 470-490.
16. Buckova D, Izakovicova Holla L, Benes P, Znojil V, Vacha J. TGF-beta1 gene polymorphisms. **Allergy.** 2001; 56: 1236-1237.
17. Cambien F., Ricard S., Troesch A., Mallet C., Generenaz L., Evans A., Arveiler D., Luc G., Ruidavets J.B. & Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension.** 1996; 28(5): 881-887.
18. Colletta A.A., Wakefield L.M., Howell F.V., Danielpour D., Baum M. & Sporn M.B. The growth inhibition of human breast cancer cells by a novel synthetic progestin involves the induction of transforming growth factor beta. **J Clin Invest.** 1991; 87: 277-283.
19. Cork MJ, Crane AM, Duff GW. Genetic control of cytokines. Cytokine gene polymorphisms in alopecia areata. **Dermatol Clin.** 1996; 14(4): 671-8.
20. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A.; 1999. p. 79-100.
21. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and Repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Pathologic basis of Disease.** 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994. p. 51-92.
22. Cox, E. D., Hoffmann, S. C., Di Mercurio, B. S., Wesley, R. A., Harlan, D. M., Kirk, A. D. & Blair, P. J. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. **Transplantation.** 2001; 72: 720-726.

23. Curtis DA, Kao R, Plesh O, Finzen F, Franz L. Crevicular fluid analysis around two failing dental implants: a clinical report. **J Prosthodont**. 1997; 6: 210-214.
24. Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1993; 8: 137-144.
25. Deas DE, Mikotowicz JJ, Mackey SA, Moritz AJ. Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. **Implant Dent**. 2002; 11(3): 235-242.
26. Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B. & Goeddel D.V. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. **Nature**. 1985; 316: 701-705.
27. Dioszegi M, Cannon P, Van Wart H. Vertebrate Collagenases. **Methods Enzymol**. 1995; 248: 413-449.
28. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. **J Periodontol**. 1998; 69: 899-910.
29. Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. **Matrix Biol**. 2000; 19: 175-177.
30. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Linden U, Lundqvist S, Rundercrantz T, Johansson LA, Nilner K, Billstrom C. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. **Clin Oral Implants Res**. 2001; 12: 462-467.
31. Emonard H, Grimaud J-A. Matrix Metalloproteinases. **Cell Molec Biol**. 1990; 36: 131-153.
32. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. **Eur J Oral Sci**. 1998; 106: 721-764.
33. Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Lekholm U. Histopathologic observations on early oral implant failures. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14: 798-810.
34. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. **Biochem J**. 1996; 315: 335-342.

35. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Burgin W, Bragger U, Buser D, Duff GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. **Clin Oral Implants Res.** 2003; 14(1): 10-17.
36. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer.** 2002; 95: 1902-1910.
37. Friberg B, Jemt T, Lekholm U. Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1991; 6(2): 142-146.
38. Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, Sammel M, Macones G, Kuivaniemi H, Romero R, and Strauss III JF. A Single Nucleotide Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Promoter Influences Amnion Cell MMP-1 Expression and Risk for Preterm Premature Rupture of the Fetal Membranes. **J Biol Chem.** 2002; 277: 6296-6302.
39. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. **Lab Invest.** 1998; 78: 755-762.
40. Gorman LM, Lambert PM, Morris HF, Ochi S, Winkler S. The effect of smoking on implant survival at second-stage surgery: DICRG Interim Report No. 5. Dental Implant CLinical Research Group. **Implant Dent.** 1994; 3: 165-168.
41. Grainger D.J. & Metcalfe J.C. Transforming growth factor-beta and cardiovascular protection. In: Rubanyi, G.M. & Dzau, V.J. **The Endothelium in Clinical Practice Source and target of Novel Therapies.** 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1997. p. 203-243.
42. Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P.R., Metcalfe J.C., Carter N.D. & Spector T.D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet.** 1999; 8: 93-97.
43. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. **Nat Med.** 1995; 1: 74-79.

44. Grainger DJ, Percival J, Chiano M, Spector TD. The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. **Osteoporos Int**. 1999; 9: 398-404.
45. Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. **J Am Dent Assoc**. 2000; 133: 452-459.
46. Gross J, Nagai Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1962; 54: 1197-1203.
47. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. **J Biomed Mater Res**. 1996; 31: 19-26.
48. Harrison N.K., Argent A.C., McAnulty R.J., Black C.M., Corrin B. & Laurent G.J. Collagen synthesis and degradation by systemic sclerosis lung fibroblasts. Responses to transforming growth factor-beta. **Chest**. 1991; 99: 71S-72S.
49. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. **J Biol Chem**. 1986; 261(6): 2814-2818.
50. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. **Am J Respir Crit Care Med**. 1998; 158: 1958-1962.
51. Hoffmann, S. C., Stanley, E. M., Darrin Cox, E., Craighead, N., DiMercurio, B. S., Koziol, D. E., Harlan, D. M., Kirk, A. D. & Blair, P. J. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**. 2001; 72: 1444-1450.
52. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. **J Biol Chem**. 1997; 272: 22053-22058.
53. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1995; 10: 33-42.

54. Ingman T, Kononen M, Kontinen YT, Siirila HS, Suomalainen K, Sorsa T. Collagenase, gelatinase and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implants and natural teeth. **J Clin Periodontol**. 1994; 21: 301-307.
55. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. **J Periodontol**. 1991; 62(1): 2-4.
56. John, S., Turner, D., Donn, R., Sinnot, P., Worthington, J., Ollier, W. E. R., Hutchinson, I. V. & Hajeer, A. H. Two novel biallelic polymorphism in the IL-2 gene. **European Journal of Immunogenetics**. 1998; 25: 419-420.
57. Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Terakawa N, Nakamura Y. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. **Cancer Res**. 1999; 59: 4225-4227.
58. Kao RT, Curtis DA, Richards DW, Preble J. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1995; 10: 696-701.
59. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. **J Orthod**. 2000; 27(3): 227-33.
60. Kikuchi S, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An assessment of the association between IL-2 gene polymorphisms and Japanese patients with multiple sclerosis. **J Neurol Sci**. 2002; 205: 47-50.
61. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. **J Biol Chem**. 1989; 264(1): 402-408.
62. Knauper V, Osthues A, DeClerck YA, Langley KE, Blaser J, Tschesche H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. **Biochem J**. 1993; 291; 847-854.
63. Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. **Int J Cancer**. 1997; 70: 722-726.
64. Kronstrom M, Svensson B, Erickson E, Houston L, Braham P, Persson GR. Humoral immunity host factors in subjects with failing or successful titanium dental implants. **J Clin Periodontol**. 2000; 27(12): 875-882.

65. Lácha J., Hubacek J.A., Potmesil P., Viklicky O., Malek I. & Vitko S. TGF-beta I gene polymorphism in heart transplant recipients--effect on renal function. **Ann Transplant.** 2001; 6: 39-43.
66. Lambert PM, Morris HF, Ochi S. Positive effect of surgical experience with implants on second-stage implant survival. **J Oral Maxillofac Surg.** 1997; 55: 12-18.
67. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol.** 2002; 40(1): 43-48.
68. Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Branemark PI, Eriksson B, Rockler B, Lindvall AM, Yoneyama T. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1986; 15: 53-61.
69. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Linden U, Bergstrom C, van Steenberghe D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1999; 14: 639-645.
70. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. **J Dent Res.** 1997; 76: 1667-1674.
71. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **J Biol Chem.** 1990; 265: 17238-17245.
72. Maniatis A, Tsakanikas S, Stamatellou M, Papanastasiou K. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. **Blood.** 1989; 74(3): 1177.
73. Massagué, J. The transforming growth factor- β family. **Ann Rev Cell Biol.** 1990; 6: 597-641.
74. Matesanz F, Fedetz M, Collado-Romero M, Fernandez O, Guerrero M, Delgado C, Alcina A. Allelic expression and interleukin-2 polymorphisms in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.** 2001; 119(1): 101-105.
75. McKinney RV Jr, Steflick DE, Koth DL, Singh BB. The scientific basis for dental implant therapy. **J Dent Educ.** 1988; 52: 696-705.

76. Mier JW, Dinarello CA, Atkins MB, Punsal PI, Perlmutter DH. Regulation of hepatic acute phase protein synthesis by products of interleukin 2 (IL 2)-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **J Immunol.** 1987; 139(4): 1268-1272.
77. Mourant AE, Godber MJ, Kopec AC, Tills D, Woodhead BG. Genetical studies at high and low altitudes in Ethiopia. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.** 1976; 194: 17-22.
78. Mourant AE, Tills D, Domaniewska-Sobczak K. Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc system of plasma proteins. **Hum Genet.** 1976; 33(3): 307-14.
79. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. **Kidney Int.** 1997; 51:1376-1382.
80. Musso T., Espinoza-Delgado I., Pulkki K., Gusella G.L., Longo D.L. & Varesio L. Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. **Blood.** 1990; 76: 2466-2469.
81. Mustoe T.A., Pierce G.F., Thomason A., Gramates P., Sporn M.B. & Deuel T.F. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. **Science.** 1987; 237: 1333-1336.
82. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. **J Immunol.** 1985; 135(4): 2492-2497.
83. Nishioka Y, Kobayashi K, Sagae S, Ishioka S, Nishikawa A, Matsushima M, Kanamori Y, Minaguchi T, Nakamura Y, Tokina T, Kudo R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinomas. **J Cancer Res.** 2000; 91: 612-615.
84. Ogata Y, Kukita A, Kukita T, Komine M, Miyahara A, Miyazaki S, Kohashi O. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. **J Immunol.** 1999; 162: 2754-2760.
85. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest.** 1995; 72: 311-322.



86. Panagakos FS, Aboyoussef H, Dondero R, Jandinski JJ. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1996; 11: 794-799.
87. Parkes M, Satsangi J & Jewell D. Contribution of the IL-2 and IL-10 genes to inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility. **Clinl Exp Immunol**. 1998; 113: 28-32.
88. Perala DG, Chapman RJ, Gelfand JA, Callahan MV, Adams DF, Lie T. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. **J Periodontol**. 1992; 63: 426-430.
89. Pinto AVS, Miyagusko JM, Ramalho AS, Wassall, T, Pereira LAV. Fatores de risco, complicações e fracassos na terapêutica com implantes osseointegrados. In: Feller, Christa; Gorab, Riad. **Atualização na clínica odontológica: módulos de atualização**. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p.133-216.
90. Polyak, K. Negative regulation of cell growth by TGF-beta1. **Biochim Biophys Acta**. 1996; 1242: 185-199.
91. Pulleyn L.J., Newton R., Adcock I.M. & Barnes P.J. TGF-beta1 allele association with asthma severity. **Hum Genet**. 2001; 109: 623-627.
92. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92- kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. **J Cell Biol**. 1994; 124: 1091-1102.
93. Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **Eur J Immunogenet**. 2000; 27(4): 241.
94. Ries Wr, Seeds Mc & Key LI. Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity: increased acid production and radioactive calcium release. **J Periodont Res**. 1989; 24: 242-246.
95. Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AEL, Davies G, Henry PJ, Price P. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? **J Periodont Res**. 2002; 37: 37-41.
96. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. **Endocr Res**. 1997; 17: 308-332.

97. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. **Cancer Res.** 1998; 58: 5321-5325.
98. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, Smith FW, Collins JG, Socransky SS, Offenbacher S. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1997; 12: 32-42.
99. Salonen MA, Oikarinen K, Virtanen K, Pernu H. Failures in the osseointegration of endosseous implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1993; 8(1): 92-97.
100. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, Offenbacher S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. **J Periodontal Res.** 1998; 33: 212-225.
101. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques.** 1994; 17(5): 914-921.
102. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr. RB, Line, SRP. Investigation of an il-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2002; 29: 587-591.
103. Schierano G, Bellone G, Cassarino E, Pagano M, Preti G, Emanuelli G. Transforming growth factor-beta and interleukin 10 in oral implant sites in humans. **J Dent Res.** 2003; 82(6): 428-432.
104. Schon R, Ohno K, Kudo M, Michi K. Peri-implant tissue reaction in bone irradiated the fifth day after implantation in rabbits: histologic and histomorphometric measurements. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1996; 11(2): 228-238.
105. Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. **Clin Oral Implants Res.** 2003; 14(4): 423-429.
106. Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. **J Periodontal Res.** 1997; 32: 166-171.
107. Seymour GJ, Gemmell E, Lenz LJ, Henry P, Bower R, Yamazaki K. Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1989; 4: 191-198.

108. Shernoff AF, Colwell JA, Bingham SF. Implants for type II diabetic patients: interim report. VA Implants in Diabetes Study Group. **Implant Dent.** 1994; 3(3): 183-185.
109. Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. **J Prosthet Dent.** 1989; 62(5): 567-572.
110. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gambie JR. Transforming growth factor beta-1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. **J Immunol.** 1996; 157: 360-368.
111. Souza AP. Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade de metaloprotease da matriz secretada por células de tecido gengival. Tese de Mestrado, FOP-UNICAMP, 2000.
112. Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dent Mater.** 2000; 16(2): 103-108.
113. Souza A.P., Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Brito Jr. R.B. & Line S.R.P. Analys of TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patient with chornic periodontitis. **J Clin Periodontology.** 2003a.
114. Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr. RB, Line SRP. MMP1 Promoter Polymorphism: Association With Chronic Periodontitis Severity In A Brazilian Population. **J Clin Periodontol.** 2003b; 30: 154-158.
115. Souza SJ, *et al.* Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. **Ciência e Cultura.** 1993; 45: 313-318.
116. Spiekermann H, Donath K, Hasell T M, Jovanovic S, Richter E-J. **Implantology – Color Atlas of dental Medicine.** ed. New York: Georg Thime Verlag, Stuttgart, Thieme Medical Publishers, Inc, 1995. 3880p.
117. Stanford CM. Biomechanical and functional behavior of implants. **Adv Dent Res.** 1999; 13: 88-92.
118. Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. **Biochemistry.** 1983; 22: 61-68.

119. Sun Y, Zhang W, Lu Y, Hu Y, Ma F, Cheng W. Role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in repairing of bone defects. **Chin Med Sci J.** 1996; 11: 209-214.
120. Syrris P., Carter N.D., Metcalfe J.C., Kemp P.R., Grainger D.J., Kaski J.C., Crossman D.C., Francis S.E., Gunn J., Jeffery S. & Heathcote K. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. **Clin Sci.** 1998; 95: 659-667.
121. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature.** 1986; 302: 305-310.
122. Teronen O, Kontinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Santavirta S, Sorsa T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. **J Dent Res.** 1997; 76: 1529-1537.
123. Tew J, Engel D, & Mangan D. Polyclonal B-cell activation in periodontitis. **J Periodont Res.** 1989; 24: 225-24.
124. Thompson, MW; Mcinnes, RR; Willard, HF; Thompson & Thompson: **Genetics in Medicine.** 5. ed. Pensilvania: Philadelphia, 1991. 500p.
125. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. **J Immunol.** 1987; 138: 775-779.
126. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. **J Exp Med.** 1986; 164: 104-112.
127. Tonetti MS. Risk factors for osseodisintegration. **Periodontol 2000.** 1998; 17: 55-62.
128. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumour trnsfected with a murine transforming growth factor type β_1 cDNA escapes immune surveillance. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990; 87(4): 1486-1490.
129. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr. RB, Souza AP, Line SRP. Polymorphism at position -174 of iL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a caucasian brazilian population. **J Clin Periodontol.** 2003; 30: 438-442.

130. Tsutsui T, Kawaguchi H, Fujino A, Sakai A, Kaji H, Nakamura T. Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. **J Orthop Sci.** 1999; 4: 32-38.
131. Van Wart He, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci.** 1990; 87: 5578-5582.
132. Vijaykumar Mb, *et al.* Immunofluorescence quantitation of stromelysin in human synovial fibroblasts by confocal laser scanning microscopy. **Lab Invest.** 1995; 72: 484-490.
133. Wang D., Kanuma T., Mizunuma H., Takama F., Ibuki Y., Wake N., Mogi A., Shitara Y. & Takenoshita S. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. **Cancer Res.** 2000; 60: 4507-4512.
134. Weeks Jg, Halme J, Woessner Jfjr. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. **Biochem Biophys Acta.** 1976; 445: 205-214.
135. Weiss CM. Tissue integration of dental endosseous implants: description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. **J Oral Implantol.** 1986; 12: 169-214.
136. Weyant RJ & Burt BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. **J Dent Res.** 1993; 72: 2-8.
137. Wilson M, Reddi K, & Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. **J Periodont Res.** 1996; 31: 393-407.
138. Wilson TG Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. **J Periodontol.** 1999; 70: 724-729.
139. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density. **Matrix Biology.** 2002; 21: 389-392.
140. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Circulation.** 1999; 99: 1788-1794.

 UNICAMP	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Associação entre polimorfismos gênicos e perda de implantes osseointegrados", sob o protocolo nº 006/2002, das Pesquisadoras Maria Cristina Leme Godoy dos Santos e Maria Isabela Guimarães Campos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.</p>		
<p>Piracicaba, 16 de agosto de 2002</p>		
<p>We certify that the research project with title "Association Between Genetic Polymorphisms and the of lose dental implants", protocol nº 006/2002, by Researcher Maria Cristina Leme Godoy dos Santos and Maria Isabela Guimarães Campos responsibility by Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).</p>		
<p>Piracicaba, SP, Brazil, August 16 2002</p>		
<p><i>Fernanda Klein Marcondes</i> Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes Secretário em Exercício CEP/FOP/UNICAMP</p>	<p><i>Pedro Luiz Rosalen</i> Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen Coordenador em Exercício CEP/FOP/UNICAMP</p>	

Anexo 2: Características clínicas do grupo controle.

Paciente	Sexo	Idade	Raça	Número implantes colocados	Região dos implantes colocados	Tempo de permanência dos implantes
C1	M	60	Branca	02	24,25	1 ano e 4 meses
C2	F	23	Branca	01	23	4 anos e 3 meses
C3	M	46	Branca	01	21	1 ano e 10 meses
C4	M	21	Branca	01	11	3 anos e 5 meses
C5	M	29	Branca	01	11	01 ano e 6 meses
C6	M	21	Negro	01	12	01 ano
C7	M	55	Parda	05	34,35,36,45,46	2 anos e 9 meses
C8	F	68	Branca	04	12,22,24,25	2 anos e 5 meses
C9	M	25	Branca	02	31,41	1 ano e 8 meses
C10	F	48	Branca	02	33,43	3 anos e 11 meses
C11	F	37	Parda	02	36,37	1 ano
C12	F	36	Parda	01	36	1 ano e 9 meses
C13	F	51	Branca	04	44,42,32,34	10 meses
C14	F	56	Parda	04	42,43,44,45	1 ano e 1 mês
C15	F	48	Parda	02	36,46	1 ano
C16	F	23	branca	02	13,23	1 ano e 6 meses
C17	F	52	Parda	03	44,45,46	1 ano e 9 meses
C18	F	37	parda	03	34,35,36	1 ano
C19	F	45	Negro	04	12,22,16,26	1 ano e 3 meses
C20	F	42	Branca	02	11,21	1 ano
C21	M	52	Pardo	01	22	20 meses
C22	M	45	Pardo	02	11,21	23 meses
C23	F	71	Branco	04	14,12,22,24	18 meses
C24	M	57	Branco	04	33,36,43,46	3 anos e ½
C25	F	45	Branco	02	35,36	6 anos
C26	M	48	Branco	03	24,25,26	4 anos e 8 meses
C27	F	43	Branco	04	24,36,37,45	2 anos e 4 meses
C28	F	53	Branco	01	36	12 meses
C29	F	46	Branco	02	36,46	3 anos e 9 meses
C30	M	37	Branco	02	11,21	3 anos e 5 meses
C31	M	23	Branco	04	33,34,35	4 anos
C32	M	43	Branco	01	12	3 anos e 7 meses
C33	M	33	Branco	03	23,45,46	2 anos
C34	F	34	Branco	01	24	2 anos e 3 meses
C35	F	50	Branco	03	11,12,13	4 anos e 4 meses
C36	M	42	Branco	01	46	2 anos e 10 meses
C37	F	26	Branco	02	13,23	2 anos e 8 meses
C38	F	47	Branco	03	15,24,25	4 anos
C39	M	38	Branco	04	34,35,36,46	1 ano e 8 meses
C40	F	59	Branco	02	36,37	5 anos e 5 meses
	-	42,87	-	96	-----	-----

Anexo 3: Características clínicas do grupo teste.

Paciente	Sexo	Idade	Raça	Nº implantes colocados (região)	Nº implantes perdido (região)	Abutment [#]	Tempo ^{##} (meses)
T1	F	47	Parda	02 (32,43)	01 (32)	Antes	4
T2	F	48	Branca	08 (12)	01(12)	Antes	6
T3	F	53	Branca	02 (25)	01(25)	Após	8
T4	F	62	Parda	07 (34,37,44)	03 (34,37,44)	Antes	6
T5	F	50	Parda	01 (35)	01 (35)	Após	1
T6	F	51	Parda	01 (23)	01 (23)	Após	7
T7	M	63	Parda	02 (36,37)	01 (37)	Após	11
T8	F	39	Branca	08 (11,13,15,17, 22,23,26,28)	02 (17,28)	Antes	6
T9	F	38	Branca	03 (44,45,46)	02 (45,46)	Antes	4
T10	M	39	Parda	01 (36)	01(36)	Após	8
T11	M	62	Parda	01 (11)	01 (11)	Após	1
T12	M	57	Branca	06 (34,36,37, 44,46,47)	03 (37,46,47)	Antes	2
T13	M	73	Negra	06 (31,33,34, 41,43,44)	01 (32)	Após	5
T14	M	18	Branca	01 (36)	01 (36)	Antes	3
T15	M	37	Branca	04 (34,35,36,46)	01 (36)	Antes	3
T16	M	40	Branca	01 (36)	01(36)	Antes	4
T17	M	58	Branca	02 (35,36)	02 (35,36)	Antes	2
T18	M	37	Branca	01(46)	01(46)	Antes	3
T19	M	52	Branca	06 (12,22,23, 24,36,46)	01 (12)	Antes	4
T20	M	49	Branca	08 (16,22,23,24, 35,36,44,45)	01(36)	Antes	3
T21	F	59	Branca	07 (14,24,33,35, 41,43,45)	05 (33,35, 41,43,45)	Após	5
T22	F	73	Branca	01 (15)	01 (15)	Antes	6
T23	F	69	Branca	03 (14,15,16)	02 (14,16)	Após	6
T24	M	26	Branca	01(46)	01 (46)	Antes	2
T25	F	54	Branca	08 (11,21,33,34, 35,44,45,46)	03 (34,35,45)	Antes	3
T26	F	50	Branca	02 (24,25)	01(25)	Antes	4
T27	F	49	Branca	02 (32,42)	01 (42)	Antes	3
T28	F	57	Branca	02 (36,46)	01 (46)	Antes	4
	-	50,35	-	97	42	-	-

[#] Perda de implante antes ou após a conexão do *abutment*

^{##} Tempo de permanência do implante (entre a colocação e perda do implante)

Anexo 4: Artigos extraídos desta dissertação

“Early dental implant failure: A review of the literature”. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2002; 1(3): 103-111.

“Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure”. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2004. (aceito para publicação).

“Analysis of the Transforming Growth Factor- β_1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure”. *Implant Dentistry* (enviado para publicação).

“IL-2 and IL-6 gene promoter polymorphisms and early failure of dental implants”. *Journal of Periodontology* (enviado para publicação).